

Mestna občina Celje
Komisija Mladi za Celje

ANTIBIOTIČNI UČINKI NARAVNIH PRIPRAVKOV

Raziskovalna naloga

Avtorji:

Domen Goste, 9.b

Matic Kričej, 9.b

Lan Lavrinc, 9.b

Mentorica:

Marjeta Gradišnik Mirt

Celje, marec 2013

Osnovna šola Ljubečna

ANTIBIOTIČNI UČINKI NARAVNIH PRIPRAVKOV

Raziskovalna naloga

Avtorji:

Domen Goste, 9.b
Matic Kričej, 9.b
Lan Lavrinc, 9.b

Mentorica:

Marjeta Gradišnik Mirt,
predmetna učiteljica

Lektorica:

Petra Merc

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2013

Kazalo

KAZALO SLIK, TABEL IN GRAFOV	4
POVZETEK.....	5
1 UVOD.....	6
1.1 NAMEN NALOGE	6
1.2 HIPOTEZE/PREDPOSTAVKE.....	6
1.3 METODE DE LA	7
2 TEORETIČNI DEL	7
2.1 BAKTERIJE.....	7
2.1.1 RAZVOJ IN RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJ	8
2.2 GOJENJE BAKTERIJ.....	9
2.3 ANTIBIOTIKI	9
3 PRAKTIČNI DEL	11
3.1 POSTOPEK/IZVEDBA LABORATORIJSKEGA DELA.....	11
3.2 REZULTATI	17
3.3 RAZPRAVA O REZULTATIH	21
4 POTRDITEV HIPOTEZ	22
5 ZAKLJUČEK.....	23
LITERATURA, VIRI	24
ZAHVALA	25

KAZALO SLIK, TABEL IN GRAFOV

Slika 1: Prikaz oblik bakterijskih celic, različnih skupkov bakterij ter delitev bakterije (binarna fisija)	8
Slika 2: Kemijska struktura penicilina. R predstavlja radikal in ni določena skupina, saj se na tisto mesto lahko veže več skupin.	10
Slika 3: Vzorci in pripravki iz zdravilnih rastlin, ki vsebujejo antibiotične učinkovine.....	12
Slika 4: Izvlečki iz zdravilnih rastlin v sterilnih epruvetah	12
Slika 5: Denziometer	13
Slika 6: Inkulacija gojišča	14
Slika 7: Gojišča bakterij z našimi vzorci	14
Slika 8: Vsa naša gojišča bakterij z vzorci v ozadju	15
Slika 9: Merjenje velikosti zaviralnega pasu s kljunastim merilom	15
Slika 10: Gojišče bakterij na krvnem agarju	16
Slika 11: Izvleček iz česna in domači med sta imela antibiotični učinek na rast bakterij.....	17
Slika 12: Dobro vidna zaviralna kroga izvlečka česna in žajblja na bakterijo MRSA	18
Slika 13: Zaviralni krog česnovega izvlečka na E. coli – ESBL	18
Slika 14: Zaviralni krog izvlečka česna na P. aeroginoza	19
Slika 15: Sok iz čebule ni imel antibiotičnih učinkov na rast bakterij.....	21
Slika 16: Velik zaviralni krog okoli kapljice izvlečka iz česna	21
Slika 17: Skeletna formula molekule alicina.....	22
Tabela 1: Rezultati meritev premera zaviralnega kroga izvlečkov iz česna in žajblja pri izbranih vrstah bakterij	19
Tabela 2: Rezultati meritev premera zaviralnega kroga pri kuhanem in svežem izvlečku česna	20
Graf 1: Grafični prikaz rezultatov meritev premera zaviralnega kroga izvlečka iz česna na izbrane vrste bakterij	19
Graf 2: Primerjava velikosti premera zaviralnega kroga pri kuhanem in svežem česnu	20

POVZETEK

Skozi nalogo nas je vodilo zanimanje za naravne ekstrakte, ki bi lahko imeli antibiotične učinke. Tako smo na nek način hoteli preveriti iz prve roke, ali nekatere govorce o zdravilnih zeliščih držijo.

Oblikovali smo tri hipoteze. Sklepali smo, da bo vsaj eden izmed naših pripravkov imel antibiotični učinek, da bo ta učinek na različnih bakterijah in ob istem pripravku različen ter da ne bodo vsi naši pripravki imeli antibiotičnih učinkov.

Odločili smo se, da bomo raziskovalno nalogo izvajali v mikrobiološkem laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Celje, ki nam je to tudi omogočil. Tako smo najprej v šoli pripravili prevretke in izvlečke različnih zdravilnih rastlin. Le-te so v mikrobiološkem laboratoriju nanesti na že pripravljene kolonije bakterij *E. coli*, *St. aureus* ter glivo *Candida albicans*.

Večina izbranih pripravkov že v prvem poizkusu ni kazala antibiotičnih učinkovin. Le-te so namreč pokazali samo česen, žajbelj in domači med. Zaradi dobrega odziva v prvem poizkusu smo nadaljevali poizkuse z žajbljem in česnom še z bolj odpornimi bakterijami, kot so MRSA, ESBL+*E. coli* ter *Ps. aeruginosa*. Najboljše rezultate je dal česen, ki je pokazal antibiotične učinke na vseh bakterijah, z njegovo pomočjo pa smo lahko potrdili tudi drugo hipotezo, saj je bil zaviralni pas pri bolj odpornih bakterijah manjši. Tako smo na koncu naše naloge potrdili vse na začetku zastavljene predpostavke.

1 UVOD

Za izvedbo tovrstne raziskovalne naloge smo se odločili, ker nas je zanimalo, kako pravzaprav delujejo antibiotiki oz. zdravila, ki jih uporabljamo v našem vsakdanu, in ali jih lahko nadomestimo s kakšnimi preprostejšimi pripravki. Tako smo se posledično usmerili v izdelavo te raziskovalne naloge, ki je v nas vzbudila še večje zanimanje za tovrstna področja, sploh po tem, ko smo si ogledali notranjost mikrobiološkega laboratorija v Zdravstvenem domu Celje.

Tako smo za svojo raziskovalno nalogo osnovali nekaj osnovnih predpostavk (hipotez), ki so nas usmerjale pri izdelavi naše raziskovalne naloge. Opazili smo tudi, da je bila podobna raziskovalna naloga v sklopu naše šole že narejena, zato smo se odločili naše delo osnovati na podobnem, tj. »že preverjenem« principu iz prejšnje naloge, pri čemer smo naš praktični del malce predrugačili oz. razširili, vendar na žalost ob koncu nalog nismo uspeli primerjati.

1.1 NAMEN NALOGE

Osnovni namen naloge je bil raziskati antibiotični učinek izbranih rastlin in pripravkov, ki jih sicer uporabljamo v vsakdanjem življenju in naj bi ta učinek imele. Istočasno nas je zanimalo, katera rastlina oz. pripravek ima najmočnejši antibiotični učinek in bi jo tako, vsaj v teoriji, lahko tudi priporočili v namene zdravljenja. Naše delo smo izvajali v šolskem laboratoriju, kjer smo pripravili vzorce, ki pa so jih testirali v mikrobiološkem laboratoriju Zdravstvenega doma Celje. Pred začetkom eksperimentalnega dela pa smo oblikovali nekaj hipotez in naredili načrt izdelave raziskovalne naloge.

1.2 HIPOTEZE/PREDPOSTAVKE

Za lažje izvajanje praktičnega dela smo se odločili postaviti na začetku naloge nekaj hipotez oz. predpostavk. Tako smo predpostavljali, da bo vsaj eden izmed naših pripravkov imel antibiotični učinek. Naša druga predpostavka pa je bila, da se bodo različni pripravki odzvali različno na različne vrste bakterij, s pomočjo katerih smo ugotavljali antibiotični učinek. Naša zadnja predpostavka pa je bila, da ne bodo vsi naši pripravki dejansko imeli antibiotičnega učinka – menili smo, da bi, vsaj v nekaterih primerih, to lahko bila posledica tudi nizke koncentracije spojin z antibiotičnim učinkom.

1.3 METODE DELA

Še pred začetkom naše raziskovalne naloge smo skovali načrt, kako bomo naše delo sploh usmerjali. Tako smo začeli s preprostim pregledom literature, ki nam je dala vsaj majhno podlago za nadaljnje delo. Nadaljevali smo s praktičnim delom – najprej smo delo seveda načrtovali, za kar smo se morali posvetovati tudi s pristojnimi v ZD Celje, ki so nam priskrbeli sterilne pripomočke za izdelavo pripravkov kar v šolskem laboratoriju. Praktično delo smo dokumentirali s fotografijami, ki nazorno prikazujejo rezultate našega dela.

Na koncu smo se posvetili težjemu – tj. pisnemu delu raziskovalne naloge, kjer smo vse rezultate zbrali in jih uredili ter med seboj primerjali in na podlagi njih ovrgli oz. potrdili že prej postavljene hipoteze.

2 TEORETIČNI DEL

Pred začetkom praktičnega dela smo skrbno preučili teoretično plat naše raziskovalne naloge. Ugotovili smo, da bi morali za lažje razumevanje preučiti predvsem bakterije in njihov razvoj ter antibiotike in kako le-ti vplivajo na razvoj oz. razmnoževanje bakterij.

2.1 BAKTERIJE

Bakterije so enocelični mikroorganizmi, ki jih sestavljajo prokariontske celice, tj. celica nima jedra in ima samo eno molekulo DNK, ki vsebuje vse informacije, potrebne za celično rast in njeno razmnoževanje (*M. Gubina, A. Ihan: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo (2002)*). Njihov dedni material je razpršen po citoplazmi. Njihove celice nimajo nekaterih organelov (npr. mitohondrijev).

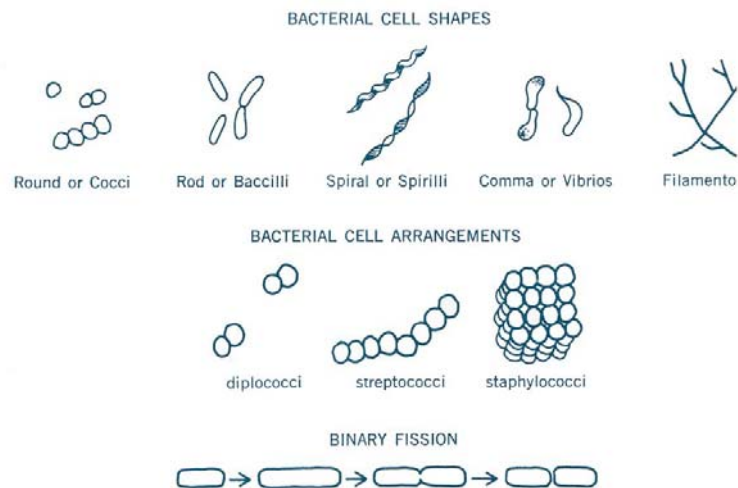
Glede na obliko, ki jo bakteriji zagotavlja celična stena, razdelimo bakterije v dve osnovni skupini: koke (kroglaste bakterije) ter bacile (paličaste bakterije) in še nekatere vmesne skupine (kokobacili). Bakterijske celice so lahko dolge od 0,3 do 20 μm , njihov premer pa je po večini 1 μm (*M. Gubina, A. Ihan: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, 2002*).

Bakterije moramo za lažje opazovanje pod mikroskopom obarvati. Bakterije najprej obarvamo z vijoličnim barvilom, ki ga zadržijo bakterije, ki jih imenujemo Gram pozitivne. Bakterije, ki se ob dodatku topila razbarvajo in jih moramo zato obarvati z

rdečim barvilom, imenujemo Gram negativne. Do tega pojava pride zaradi razlik v kemijski zgradbi celičnih sten bakterij.

2.1.1 RAZVOJ IN RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJ

Razvoj bakterije je odvisen od tega, v kakšnem okolju se ta bakterija razmnožuje oz. raste. Če je okolje primerno in ji zagotavlja vsa potrebna hranila oz. doprinese k njeni presnovi, bakterija začne rasti. Njena celična stena se podaljšuje. Ko tako bakterija zraste do neke točke (tj. kritične velikosti), se razdeli na dve hčerinski celici, ki ciklus nadaljujeta. Tovrstno delitev imenujemo delitev na dvoje oz. *binarna fisija* (*M. Gubina, A. Ihan: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, 2002*). Po delitvi lahko celici bakterij ostaneta povezani («zlepljeni»). Tako dobimo različne »strukture« bakterij, npr. pare (pnevmokoki), verižice (streptokoki) ter skupke (stafilokoki).



Slika 1: Prikaz oblik bakterijskih celic, različnih skupkov bakterij ter delitev bakterije (binarna fisija)

(Vir slike:

<http://www.caes.uga.edu/applications/publications/files/html/B817/images/bacterial%20cell%20shapes.jpg>)

Zgornja slika v osrednjem delu prikazuje najprej pare bakterijskih celic, nato verigo streptokokov ter skupek stafilokokov. Prvi del fotografije prikazuje oblike bakterijskih celic, spodnji del slike pa prikazuje binarno fisijo. Še posebej lepo je vidno podaljšanje celične stene.

Čas, ki ga porabi ena celica bakterija za razdelitev na dve celici v idealnih pogojih, imenujemo generacijski čas in je pri večini bakterij med 15 in 20 minut. Ravno zaradi tega so bakterije izjemno prilagodljive na morebitne spremembe v svojem okolju, saj veliko število delitev v kratkem času pomeni tudi večje število mutacij, ki nastanejo pri teh delitvah, to pa vodi v večjo genetsko pestrost in s tem večjo možnost za obstanek tudi v sicer neugodnih razmerah.

Glede na presnovo hranil lahko bakterije razdelimo v več vrst:

- striktno aerobne za svoj razvoj potrebujejo kisik);
- striktno anaerobne (za svoj razvoj ne potrebujejo kisika, saj uporabljajo drugačne oksidante, ker pa ne morejo proizvajati encimov za razgradnjo kisika, je kisik zanje celo strupen),
- fakultativno anaerobne bakterije (bakterije, ki ob njegovi prisotnosti uporabljajo za presnovo hranil kisik, sicer pa presnavljajo hranila s pomočjo fermentacije oz. anaerobne respiracije – tj. kemičnih procesov, ki ne vključujejo kisika),
- aerotolerantne anaerobne bakterije (pri presnovi ne uporabljajo kisika, vendar pa zanje le-ta ni toksičen, saj imajo encime za njegovo razgradnjo)(*M. Gubina, A. Ihan: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo,2002*)

Takoj lahko opazimo, da so okolja, v katerih so bakterije zmožne preživeti, lahko zelo raznolika. Z medicinskega stališča pa so najbolj številčne in pomembne fakultativno anaerobne bakterije, saj so najbolj prilagojene za preživetje v človeškem telesu.

2.2 GOJENJE BAKTERIJ

Bakterije, ki so bile za našo raziskovalno nalogo relevantne, so povečini heterotrofe, kar pomeni, da si niso sposobne same proizvajati hrane, temveč potrebujejo za razvoj neko količino hranil iz okolja. Te bakterije so namreč z medicinskega stališča najbolj pomembne, z njimi se tudi najpogosteje srečujemo.

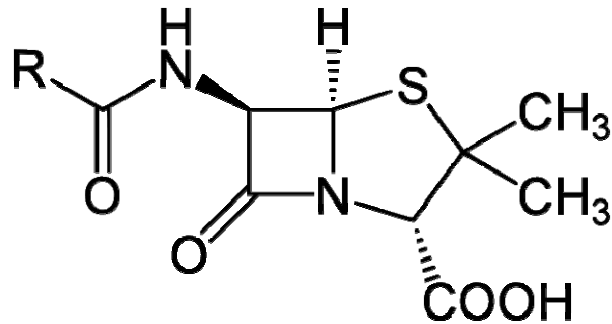
Bakterije v laboratorijih gojimo v petrijevkah na hranilni podlagi, ki je sicer sestavljena predvsem iz agarja in zagotavlja bakterijam vse potrebne hranilne snovi, ki jih potrebujejo za normalen razvoj. Pri tem velja omeniti, da vsaka kolonija bakterij, ki nastane, prikazuje razvoj ene bakterijske celice.

Za naše potrebe so nam v mikrobiološkem laboratoriju ZD Celje pripravili gojišča bakterij, ki so bila razporejena zelo enakomerno, tako da je bakterija v končni fazi pokrivala večino hranilne podlage. Točno takšna gojišča pa so potrebna tudi pri standardnih testiranjih rezistence določenih bakterij na različne antibiotike. Mi smo svoje hipoteze preizkusili na zelo podoben način.

2.3 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so kemične spojine, ki zavirajo rast bakterij oz. jih uničijo. Razdelimo jih na antibiotike širokega spektra, ki delujejo na več vrst bakterij, ter antibiotike ozkega spektra, ki delujejo na manj vrst oz. samo eno.

Doba antibiotikov v zgodovini človeštva se je začela z odkritjem penicilina l. 1928, ko ga je odkril škotski znanstvenik Alexander Fleming, ki je do svojega odkritja prišel naključno. Penicilin namreč proizvajajo glive roda *Penicillium notatum*, ki so se naselile v njegovi koloniji stafilokokov, ki jo je bil pustil odprto. Okrog kolonije gliv je nastal rezistenčni pas, na podlagi katerega je sklepal, da ima neka snov, ki jo te glive proizvajajo, antibiotični učinek.



Slika 2: Kemijska struktura penicilina. R predstavlja radikal in ni določena skupina, saj se na tisto mesto lahko veže več skupin.

(Vir slike: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Penicillin_core.svg)

Za penicilin in še nekatere antibiotike je značilno, da zavrejo gradnjo celične stene, ki vodi v delitev bakterijske celice. Tako v končni fazi preprečijo razmnoževanje bakterij.

Antibiotike je sicer človeštvo uporabljalo že dolgo časa, in sicer v obliki zdravilnih rastlin oz. izvlečkov, ki smo se jih odločili proučiti tudi v naši raziskovalni nalogi. Tako naj bi imeli antibiotične učinke med drugim tudi česen, čebula, žajbelj, ameriški slamnik, meta, domači med ter čemaž.

3 PRAKTIČNI DEL

Praktični del je bil pri tej raziskovalni nalogi izjemno preprost in hiter, saj smo še isti dan, ko smo pripravili ekstrakte zelišč, nesli te raztopine na Oddelek za mikrobiologijo, ki deluje v okviru Zavoda za zdravstveno varstvo Celje. Tako smo namreč zmanjšali možnost kontaminacij, ki bi lahko bile posledice različnih mikroorganizmov iz okolja. Pri svojem delu smo tako striktno uporabljali čiste pripomočke, mnogi pa so bili celo sterilizirani in še zapakirani v vrečkah, ko smo jih prvič dobili v roke.

3.1 POSTOPEK/IZVEDBA LABORATORIJSKEGA DELA

Praktični del naše raziskovalne naloge je potekal v dveh delih. V prvem delu smo pripravili ekstrakte različnih rastlin, začimb in zelišč, ki naj bi imele antibiotične učinke, v drugem delu pa smo nesli ekstrakte na Oddelek za mikrobiologijo, ki deluje v Zdravstvenem domu Celje, kjer so preverili antibiotični učinek le-teh.

Rastline, ki smo jih izbrali za praktično delo, so bile žajbelj, čemaž, česen, čebula, poprova meta, materina dušica, ameriški slamnik ter aloe vera. Uporabili smo pa tudi nekatere druge pripravke, kot sta npr. domači med ter kokosovo olje. Vse omenjene vzorce smo izbrali na osnovi članka iz revije Jana, z naslovom Antibiotiki iz narave, objavljenem na spletnem naslovu <http://www.jana.si/2011/01/antibiotiki-iz-narave/>. V članku lahko dobimo namige za rastline z antibiotičnim učinkom z domačega vrta, iz narave ali iz daljnih krajev. Tako naj bi česen in čebula kot antibiotično učinkovino vsebovala alicin. Poprova meta, ameriški slamnik in materina dušica vsebujejo limonen, materina dušica pa še timol, ki je tudi v žajblju. Med, zlasti pa propolis, vsebujeta kot antibiotično učinkovino snov inhibin. Čebele uporabljajo propolis kot smolo za zamašitev špranj in razkužitev panja. Kokosova maščoba vsebuje kot antibiotično učinkovino lavrinsko kislino. Idealno bi bilo, če bi imeli rastline sveže in bi lahko iz njih iztisnili sokove, ki bi vsebovali snovi, ki zavirajo rast bakterij. V zimskem času to za vse rastline ni mogoče, zato smo nekatere izbrane zdravilne rastline kupili za pripravo čajev, ki jih uživamo, če zbolimo.



Slika 3: Vzorci in pripravki iz zdravilnih rastlin, ki vsebujejo antibiotične učinkovine

(vir: osebni arhiv)

Poprovo meto, materino dušico ter ameriški slamnik smo prelili s kropom ter jih pustili stati pet minut, da so se v vodo izločile zdravilne učinkovine. S pomočjo sterilne kapalke smo nekaj mililitrov posamezne vrste čaja prenesli v sterilne epruvete, na katerih smo predhodno označili ime vzorca. Iz žajbljevih listov smo naredili prevretek. Listi so se kuhali v vodi natančno pet minut, saj se v tem primeru izloči v prevretek največ zdravilnih učinkovin. Nato smo s sterilno kapalko nekaj kapljic žajbljevega čaja prenesli v označeno sterilno epruveto. Čebulo in česen smo najprej zmleli v električnem sekljalniku, zmleti česen in čebulo pa smo stisnili skozi sterilno gazo v sterilne posodice, iz katerih smo tekoči del s kapalkami prenesli v sterilne epruvete. Kot čemaž smo uporabili kar kupljen čemažev ekstrakt, ki vsebuje čemaž vloženi v olju, ki smo ga s kapalko nato prenesli v sterilne epruvete. Kot aloe vero smo vzeli kupljeno raztopino domnevnih učinkovin te rastline. Čebelji med in kokosovo olje pa smo najprej segreti, da sta postala bolj tekoča in ju šele nato spravili v označene sterilne epruvete.



Slika 4: Izvlečki iz zdravilnih rastlin v sterilnih eprugetah

(vir: osebni arhiv)

Sterilne epruvete s pripravki smo nesli v mikrobiološki laboratorij Zavoda za Zdravstveno varstvo Celje, ki deluje v prostorih Zdravstvenega doma Celje. Prvič smo jih obiskali 11. januarja, da smo se dogovorili, kako bi preverili, ali naše hipoteze držijo. Dobili smo natančne napotke, kako naj pripravimo vzorce izbranih zdravilnih rastlin. Dobili smo tudi sterilne epruvete in sterilne plastične posodice za čaje. Nato smo 24. januarja po navodilih pripravili vzorce izbranih snovi in jih odnesli še isti dan v mikrobiološki laboratorij. Prvič pri nanosu vzorcev na gojišča bakterij nismo sodelovali. Želeli smo preveriti, če sploh lahko z nanosom manjših kapljic vzorcev snovi ugotovljamo učinek le-teh na rast bakterij. Pokazalo se je, da je zamisel izvedljiva. Naše praktično delo se je začelo 4. februarja, ko smo v dopoldanskem času v šolskem laboratoriju pripravili izbrane vzorce po prej opisanem postopku in jih ponovno odnesli na Oddelek za mikrobiologijo.

Po prihodu v laboratorij smo se najprej zaščitili z belimi plašči in pod strokovnim vodstvom odšli v manjši laboratorij, kjer se je začelo naše neposredno delo in opazovanje postopkov priprave gojišč.

Najprej smo si ogledali gojišča za bakterije. Uporabili smo Mueller Hintonov agar (okrajšano MH). Gojišče je namenjeno za testiranje mikrobno občutljivih aerobnih bakterij. Gojišče se pripravi tako, da 304 grame original dehidrirane podloge raztopimo v 8000 ml deionizirane vode. Gojišče se pripravlja v agarklavu po posebnem programu. V vsako petrijevko se nalije 24 ml gojišča, ki se počasi strdi.

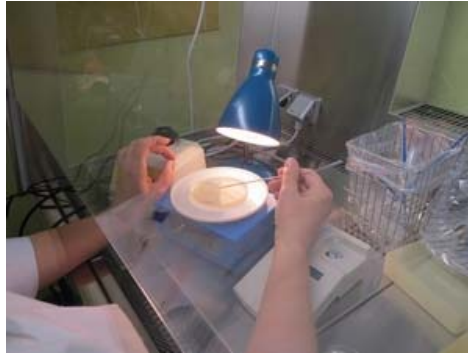
Nato sledi priprava bakterijskih gojišč. S cepilno zanko se kolonija sveže bakterijske kulture prenese v 2 ml fiziološke raztopine. Bakterijska suspenzija se mora dobro premešati na Vortex mešalu. Nato se mora s pomočjo denziometra umeriti gostota na 0,5 McFarlanda. Na takšen način je znana koncentracija bakterij na mililiter fiziološke raztopine ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml).



Slika 5: Denziometer

(vir: osebni arhiv)

Sledi postopek, ki se imenuje inokulacija gojišč. S tem postopkom kulturo bakterij enakomerno nanese na gojišče. Z vatirano palčko se dotaknemo bakterijske suspenzije in jo prenesemo na gojišče. Z rahlim dotikom se dotaknemo površine gojišča in petrijevko zavrtimo na rotatorju. Vatirana palčka z bakterijami enakomerno drsi po gojišču od roba proti sredini petrijevke. Tako pripravljeno petrijevko pustimo 3 do 5 minut, da se osuši.



Slika 6: Inokulacija gojišča

(vir: osebni arhiv)

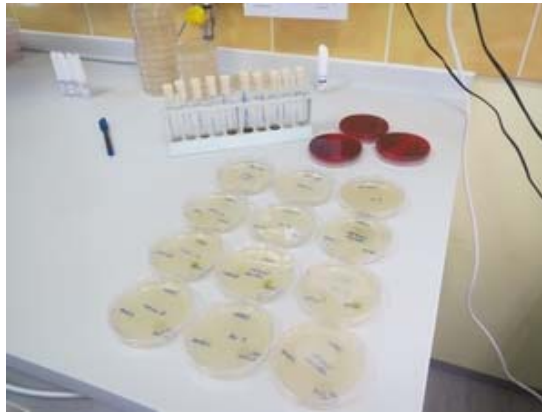
Sledi nanos diskov, ki vsebujejo antibiotike. V našem primeru smo namesto diskov uporabili 50 mikrolitrov vsakega pripravka. V vsaki petrijevki je tako bila po ena vrsta bakterije in trije različni pripravki, naneseni kot kapljice. Na sliki 7 so tri gojišča s tremi različnimi vrstami bakterij. V vsaki petrijevki so tri kapljice treh različnih vzorcev snovi, ki bi naj vsebovale antibiotične učinkovine. Z alkoholnim flomastrom je na sredini petrijevke označena vrsta bakterije, ob robovih pa so imena vzorcev.



Slika 7: Gojišča bakterij z našimi vzorci

(vir: osebni arhiv)

Na sliki 8 se v ozadju vidijo naši vzorci zdravilnih rastlin in drugih pripravkov, za katere menimo, da imajo antibiotični učinek. Spredaj je 12 petrijevk, v katerih so razporejeni vsi naši vzorci na treh vrstah bakterij. V ozadju se vidijo izbrane kolonije bakterij, ki so vzgojene na krvnem agarju.



Slika 8: Vsa naša gojišča bakterij z vzorci v ozadju

(vir: osebni arhiv)

Na rezultate smo počakali 24 ur, v tem času so se namreč bakterije enakomerno razmnožile po hranilni podlagi v petrijevki. Kjer je imel pripravek antibiotični učinek, se je okoli kapljice pokazal zaviralni pas, kjer bakterije niso rastle. Ko smo zbirali rezultate, smo merili velikost zaviralnega pasu s kljunastim merilom, rezultate pa smo nato med seboj primerjali.

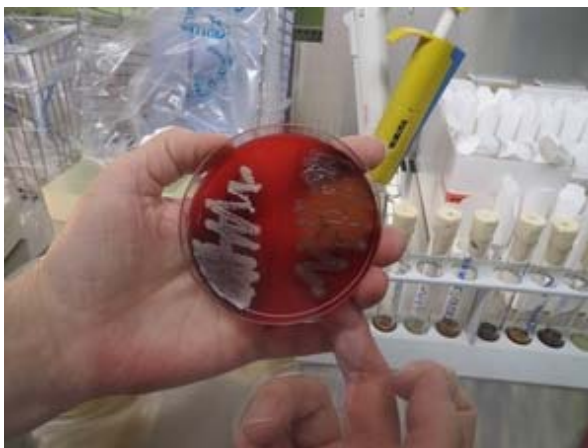


Slika 9: Merjenje velikosti zaviralnega pasu s kljunastim merilom

(vir: osebni arhiv)

Čeprav smo med delom zelo pazili na čistočo naših pripravkov, so se v nekaterih primerih kljub vsemu pokazale nečistoče v obliki drugih vrst bakterij, ki pa niso vplivali na končne rezultate, saj je bil zaviralni pas vseeno lepo viden.

Vzorci smo testirali na sledečih bakterijah: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, uporabili pa smo tudi glivo *Candida albicans*. *E. coli* je po Gramu negativni bacil, *S. aureus* je po Gramu pozitivni kok, na katere pogosto naletimo v svojem okolju.



Slika 10: Gojišče bakterij na krvnem agarju

(vir: osebni arhiv)

Po 24 urah so se pokazali zaviralni učinki na rast bakterij pri dveh vzorcih: izvlečku iz svežega česna in čaju iz žajblja. Kasneje pa smo pripravka, ki sta pokazala največji antibiotični učinek, testirali tudi na bolj rezistenčnih bakterijah, kot so bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* – *MRSA* in *Escherichia coli* – *ESBL*. *Pseudomonas aeruginosa* je pogosta bakterija, ki lahko povzroči bolezni pri živalih in ljudeh. Najdemo jo v zemlji, vodi in vsepovsod okoli nas. *Staphylococcus aureus* – *MRSA* je bakterija, ki jo mnogi nosimo na koži ali v nosu. Lahko povzroča vnetja na koži ali ognojke. Vnetja se pri odpornem človeku sama pozdravijo. V primeru vdora v telo pa lahko povzroči zelo nevarna obolenja. Najlažje se širi med bolniki v bolnišnicah, ki imajo slabše razvito odpornost. Bakterija je zelo odporna na celo vrsto antibiotikov. Zato veljajo v vseh bolnišnicah poseben režim higiene, ki omejuje širjenje te nevarne bakterije. Podobne lastnosti ima tudi *Escherichia coli* – *ESBL*. Pri vseh treh vrstah nevarnih bakterij je imel česnov izvleček zaviralni učinek na njihovo rast.

Zato smo naslednji dan v šoli še enkrat pripravili izvlečke iz česna. Polovico izvlečka smo prekuhali in ga prenesli v sterilno epruveto, polovico izvlečka pa je bilo svežega. Vpliv kuhanega in svežega česnovega izvlečka smo preučevali na bakterijah *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus* – *MRSA*.

3.2 REZULTATI

V prvih dneh smo testirali samo antibiotični učinek pripravkov in nismo opravljali nobenih meritev. Pokazalo se je, da imajo antibiotični učinek samo pripravki, kot so česen, žajbelj ter domači med. Vsi ostali pripravki niso pokazali antibiotičnih učinkov, ki bi jih mi lahko bili opazili.

V nadaljevanju smo uporabljali med iz trgovine, saj domačega medu nismo imeli. Na žalost kupljeni med ni pokazal antibiotičnih učinkov in ga zato v rezultatih ne omenjamo.

Učinkovitost pripravkov na različne bakterijske skupine smo lahko razbrali iz velikosti zaviralnega pasu okoli nanosenega vzorca na gojišču.

Naslednji rezultati prikazujejo rezultate žajbljevega čaja in česnovnega izvlečka, ki sta se najbolje odrezala kot antibiotični učinkovini. Zraven so podani še rezultati za čemaž, ki je bil v isti petrijevki, vendar ni pokazal antibiotičnega učinka.

- *St. aureus* (*Stafilococcus aureus*): okoli nanosa kapljice česnovnega izvlečka je bil zaviralni pas velik 37,69 mm, okoli nanosa izvlečka žajblja je bil zaviralni pas velik 17,52 mm, na čemažu pa so bili rezultati negativni.
- *E.coli* (*Escherichia coli*): okoli nanosa kapljice česnovnega izvlečka je bil zaviralni pas velik 27,91 mm, okoli nanosa žajbljevega in čemaževega izvlečka pa zaviralnega pasu ni bilo.
- *Candida albicans*: okoli nanosa kapljice česnovnega izvlečka je bil zaviralni pas velik 46,94 mm, okoli nanosa žajbljevega in čemaževega izvlečka pa zaviralnega pasu ni bilo.



Slika 11: Izvleček iz česna in domači med sta imela antibiotični učinek na rast bakterij

(vir: osebni arhiv)

Izвлеčki iz česna so imeli zelo velik zaviralen učinek na rast bakterij, nekoliko manjši pa tudi izvlečki iz žajblja. Drugi izvlečki ali pripravki iz zdravilnih rastlin niso kazali antibiotičnih učinkov. Zato smo za nadaljnje delo izbrali samo dva vzorca, ki sta na rast izbranih bakterij imela največji učinek.

Potem smo ponovili teste na bakterijah, kot so *Ps. Aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*), bakterija ESBL, bakterija MRSA in še na bakteriji E.coli. Tukaj smo uporabili razredčeno raztopino česnovega ekstrakta, ki je v prvih poskusih pokazal največji antibiotični učinek.

Rezultati česnovega ekstrakta na rast izbranih bakterij so bili naslednji:

- Bakterija MRSA, kjer je bil zaviralni pas 35,74 mm,
- Bakterija ESBL + *E. coli*, kjer je bil zaviralni pas 25,32 mm,
- *Ps. aeruginosa*, kjer je bil zaviralni pas 13,10 mm.

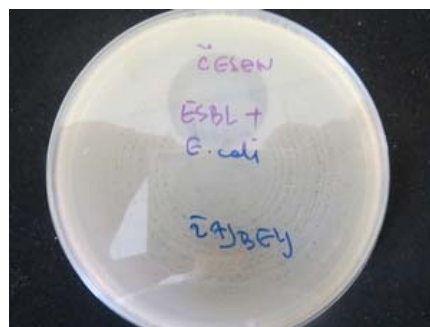
Rezultati ekstrakta žajblja na rast izbranih bakterij so bili naslednji:

- Bakterija MRSA, kjer je bil zaviralni pas 15,26 mm,
- Bakterija ESBL + *E. coli*, kjer zaviralnega pasu ni bilo,
- *Ps. aeruginosa*, kjer zaviralnega pasu ni bilo.



Slika 12: Dobro vidna zaviralna pasa izvlečka česna in žajblja na bakterijo MRSA

(vir: osebni arhiv)



Slika 13: Zaviralni pas česnovega izvlečka na *E. coli* – ESBL

(vir: osebni arhiv)



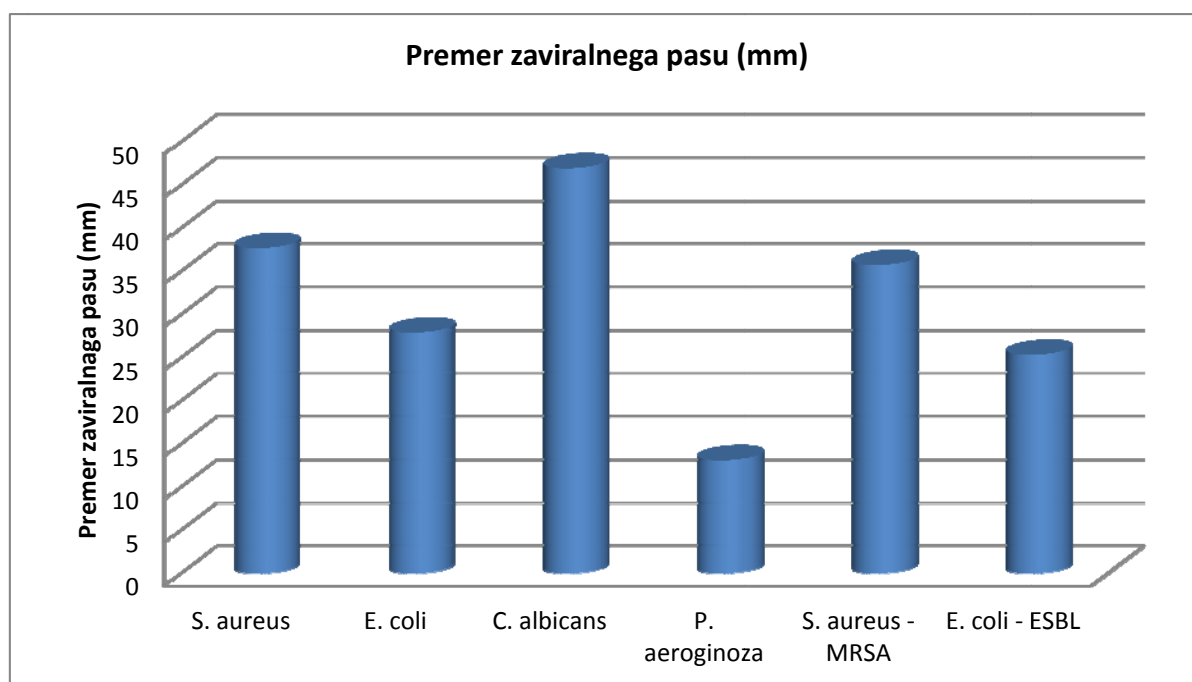
Slika 14: Zaviralni pas izvlečka česna na *P. aeroginoza*

(vir: osebni arhiv)

Tabela 1: Rezultati meritev premera zaviralnega kroga izvlečkov iz česna in žajblja pri izbranih vrstah bakterij

Vrste bakterij:	Premer zaviralnega pasu (mm)	
	Izveček iz česna	Žajbljev čaj
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	37,69	17,62
<i>Escherichia coli</i>	27,9	0
<i>Candida albicans</i>	46,94	0
<i>Pseudomonas aeruginoza</i>	13,10	0
<i>Staphylococcus aureus – MRSA</i>	35,74	15,26
<i>Escherichia coli – ESBL</i>	25,32	0

Graf 1: Grafični prikaz rezultatov meritev premera zaviralnega pasu izvlečka iz česna na izbrane vrste bakterij

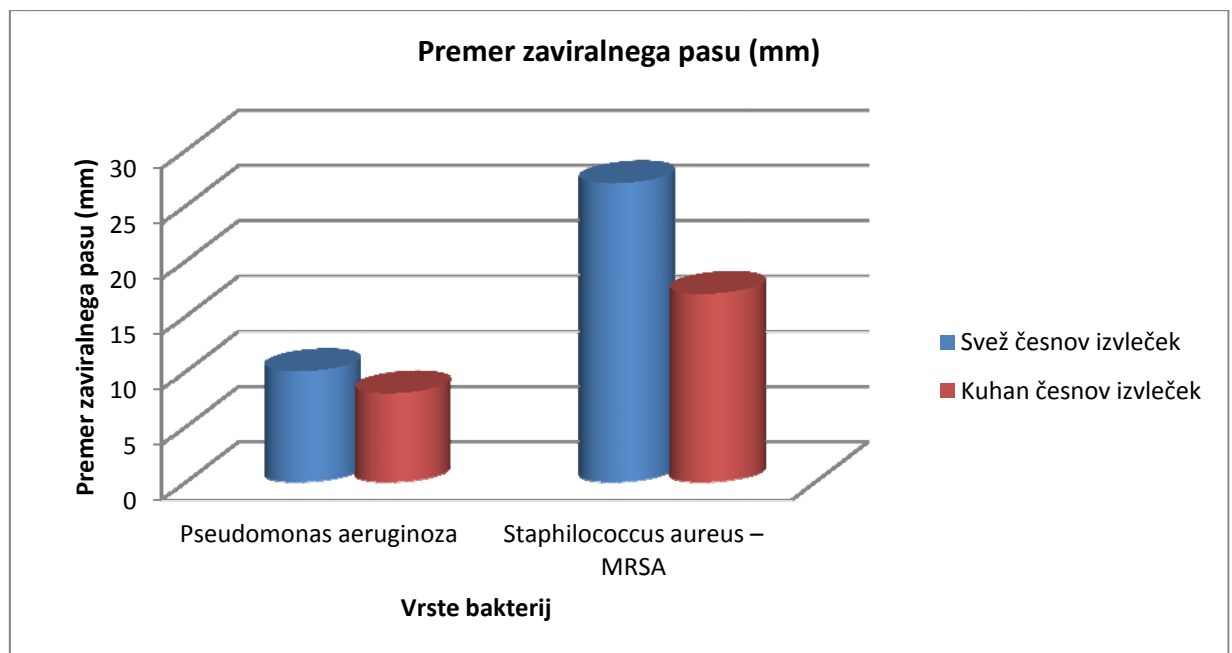


Rezultati antibiotičnega delovanja svežega in prekuhanega izvlečka iz česna na bakteriji *Pseudomonas aeruginoza* in *Staphylococcus aureus* – *MRSA* so bili prav tako poučni. Svež izvleček iz česna je imeli večji zaviralni učinek na rast bakterij kot prekuhan. Poskus je pokazal, da tudi kuhan česnov izvleček ni brez učinka.

Tabela 2: Rezultati meritev premera zaviralnega pasu pri kuhanem in svežem izvlečku česna

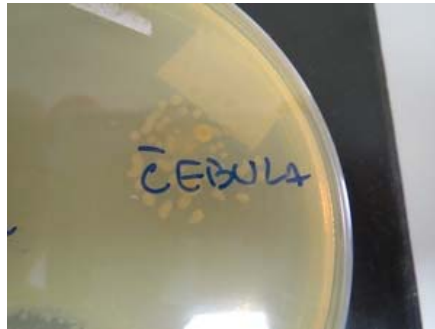
Vrste bakterij:	Premer zaviralnega pasu (mm)	
	Svež izvleček iz česna	Kuhan izvleček iz česna
<i>Pseudomonas aeruginoza</i>	10	8
<i>Staphylococcus aureus</i> – <i>MRSA</i>	27	17

Graf 2: Primerjava velikosti premera zaviralnega pasu pri kuhanem in svežem česnu



3.3 RAZPRAVA O REZULTATIH

Na začetku smo bili zelo presenečeni nad čebulo, za katero smo glede na naše izkušnje in različne zgodbe domnevali, da bo imela antibiotični učinek, saj svež izvleček iz čebule ni pokazal nobenih zaviralnih učinkov na razvoj bakterij.



Slika 15: Sok iz čebule ni imel antibiotičnih učinkov na rast bakterij

(vir: osebni arhiv)

Prav tako smo bili zelo presenečeni nad česnom, saj je pokazal izjemen antibiotični učinek, ki bi ga lahko primerjali že z učinki pravih antibiotikov – in to tudi v raztopini, ki smo jo v laboratoriju zaradi premajhne količine morali razredčiti s fiziološko raztopino. Sok iz stisnjene česna ima antibiotične učinke tako v sveži kot prekuhani obliki. Svež deluje zaviralno na vse izbrane soje bakterij. Zavira tudi razvoj nevarnih bolnišničnih bakterij, ki so sicer zelo odporne na antibiotike. Morda lahko utrdijo odpornost bolnikov v bolnišnicah z večjim vključevanjem česna v pripravo bolnišnične hrane.



Slika 16: Velik zaviralni krog okoli kapljice izvlečka iz česna

(vir: osebni arhiv)

Manjše antibiotične učinke smo zasledili pri žajblju in čemažu. Na žalost pa nismo mogli nadaljevati raziskav z domačim medom, za katerega se je na začetku pokazalo, da bi lahko imel antibiotične učinke.

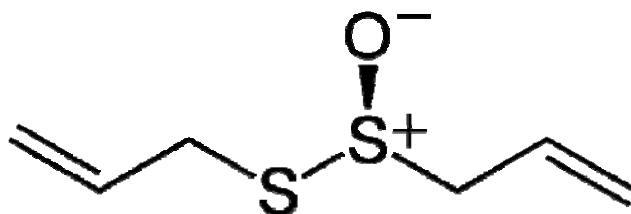
Izmed nabora vseh pripravkov, ki smo jih imeli na začetku, smo izločili mnoga zelišča ter ekstrakte. Nad tem nismo bili preveč presenečeni, saj bi do tega lahko prišlo zaradi nizke koncentracije antibiotičnih učinkovin v omenjenih zeliščih. Kljub vsemu smo z izkupičkom naloge zelo zadovoljni, saj smo lahko izluščili tiste pripravke, ki antibiotični učinek res imajo, in ga testirali tudi na bolj odpornih bakterijah (ESBL+E. coli, *Ps. aeruginosa*, MRSA).

4 POTRDITEV HIPOTEZ

Glede na dobljene rezultate lahko vse naše predpostavke potrdimo. V prvi hipotezi smo tako sklepali, da bo vsaj eden izmed naših pripravkov oz. zelišč imel antibiotični učinek. To predpostavko lahko tako potrdimo. Imeli smo namreč več pripravkov, ki so pokazali antibiotične učinke. Med njimi so tako bili najučinkovitejši česen, žajbelj ter na začetku tudi domači med. Predvsem česen je pokazal izredne antibiotične učinke na ne samo eno, temveč več vrst bakterij, med katerimi so bile nekatere izjemno rezistenčne. To se navezuje tudi na drugo hipotezo, v kateri smo predvidevali, da se bodo različne bakterije odzvale različno na iste vzorce.

Pri tej hipotezi gre torej predvsem za razlike v rezistenci bakterij na antibiotične učinkovine v posameznih ekstraktih oz. pripravkih. Že pri česnu lahko opazimo razlike v velikosti zaviralnih pasov. Večji zaviralni pasovi so namreč nastali pri manj odpornih bakterijah. Pri žajblju lahko opazimo celo, da njegove antibiotične učinkovine na nekatere bakterije sploh ne delujejo. S tem je naša druga predpostavka prav tako potrjena.

V tretji predpostavki smo sklepali, da ne bodo vsi vzorci pokazali antibiotičnih učinkovin. Tudi to potezo lahko potrdimo, saj smo že v prvem delu naših poizkusov lahko ovrgli kar večino naših pripravkov. Težko sicer rečemo, ali gre v tem primeru za nizko koncentracijo antibiotičnih učinkovin, saj tovrstnih raziskav nismo opravili, zato lahko o tem le domnevamo. Predvsem smo presenečeni za čebulo, ki naj bi vsebovala isto antibiotično učinkovino kot česen – *allicin*.



Slika 17: Skeletna formula molekule alicina

(Vir slike: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:R-allycin-2D-skeletal.png>)

5 ZAKLJUČEK

Pri tej raziskovalni nalogi smo vsi zelo uživali, saj je to področje, ki nas je vse zanimalo. Tudi z izkupičkom te naloge smo zadovoljni, čeprav menimo, da bi lahko raziskovalno nalogo še nadaljevali. Zanimive bi bile predvsem raziskave bolj kemijske narave – recimo, katere so te antibiotične učinkovine, ki naj bi jih ta zelišča oz. pripravki vsebovali in kakšna je koncentracija le-teh v določenih rastlinah, saj bi bilo to dobro upoštevati pri zaključnih rezultatih te naloge. Na žalost se je čas iztekkel prehitro in raziskav podrobneje nismo mogli nadaljevati, prav tako pa nismo imeli pri roki opreme, s katero bi lahko izvedli tako zahtevne in natančne meritve. Vsaj za česen in čebulo smo lahko iz spletnih virov izvedeli, da naj bi vsebovala antibiotično učinkovino, ki ji pravimo *alicin*. Vendar smo bili enotni, da bi po natančnejših raziskavah lahko prišli do rezultatov, ki bi morda spremenili naše mišljenje glede antibiotičnih učinkov naših pripravkov.

Nalogo bi bilo vredno ponoviti tudi za pridobitev rezultatov domačega medu – domači med je namreč pokazal na začetku kar precejšnjo mero antibiotičnih učinkov, pa vendar ga zaradi nedostopnosti in pomanjkanja časa nismo mogli podrobneje preučiti – kupljen med namreč ni dal istih rezultatov.

Ker se sami počasi poslavljamo od osnovne šole, je za nas raziskovalno delo tukaj končano. Kljub temu pa lahko s tem delom nadaljujemo na srednjih šolah in morda bomo v bodočnosti našli čas tudi za nadaljevanje teh raziskav in tako rešili nekatera še »nerešena« vprašanja.

LITERATURA, VIRI

- Gubina, M., Ihan, A., 2002, *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Ljubljana: Medicinski razgledi.
- Wikipedija, Alicin, 2013. Dobljeno 20.1.2013 na naslovu <http://en.wikipedia.org/wiki/Allicin>
- Rang, H., P., Dale, M., M., Ritter, J., M., Moore, P., K., 2003, *Pharmacology*. ZDA: Elsevier
- Wikipedija, slika skeletne formule alicina, 2013. Dobljeno na naslovu <http://en.wikipedia.org/wiki/File:R-allicin-2D-skeletal.png>
- Wikipedija, kemijska struktura penicilina, 2013. Dobljeno na naslovu http://en.wikipedia.org/wiki/File:Penicillin_core.svg
- The University Of Georgia, College of Cultural and Environmental Sciences, skica oblik bakterij, razmnoževanje bakterij ter skupkov bakterij, 2013. Dobljeno na naslovu <http://www.caes.uga.edu/applications/publications/files/html/B817/images/bacterial%20cell%20shapes.jpg>

ZAHVALA

Naša zahvala ob tej raziskovalni nalogi gre naši razredničarki ter mentorici ge. Marjeti Gradišnik Mirt, ki nas je vodila skozi vso raziskovalno nalogo ter nam priskrbela vse potrebne kontakte za izvedbo praktičnega dela naloge.

Zahvalili bi se radi tudi ge. Tjaši Žohar Čretnik za sprejem v mikrobiološkem laboratoriju Zdravstvenega doma Celje ter omogočanje izvedbe poskusov, ključnih za to raziskovalno nalogo.

Zahvaljujemo se tudi ge. Petri Merc za lektoriranje naloge.